

## 用尖吻蝮蛇毒、蝮蛇毒及抗蛇毒血清处理小鼠 $S_{180}$ 、EAC腹水癌的初步观察

熊郁良 王婉瑜 刘念昆 杨长久 攸福生

(中国科学院昆明动物研究所)

### 摘 要

本文报道了尖吻蝮蛇毒、蝮蛇毒及抗蛇毒血清能使接种  $S_{180}$ 、EAC 腹水癌的小鼠明显延长存活时间,降低接种率,但不能完全阻止癌细胞生长。体外具有较明显的导致癌细胞肿胀、膜破裂、核纤维化、坏死等。从腹水酶活力测定及抗血清初步研究结果表明,癌细胞病变中产生的某些抗原物质可能与蛇毒中的酶和毒蛋白相近。因此注射蛇毒后可在体内产生相关抗体,中和癌细胞产生的毒素以达到治疗目的。

**关键词:**  $S_{180}$ , EAC, 蝮蛇毒, 尖吻蝮蛇毒, 抗蛇毒血清

蛇毒对肿瘤细胞的作用国内外报道较多 (Braganca, 1974), 但多着重在体外对癌细胞的杀死作用和体内抑制作用。近年来上海徐汇区医院等采用口服眼镜蛇毒和蝮蛇毒等治疗各种癌症患者取得较好疗效。为增进有关蛇毒治疗肿瘤的认识, 本文以抗蛇毒血清和蛇毒纯组分进行了初步对比观察。

### 材 料 和 方 法

#### 材料:

蝮蛇 (*Agkistrodon halys*) 毒: 浙江产; 尖吻蝮蛇 (*Agkistrodon acutus*) 毒: 湖南产; 尖吻蝮、蝮蛇毒精制抗蛇毒血清: 上海生物制品研究所生产; 尖吻蝮去纤酶、蝮蛇毒纤溶组分: 本实验室分离、制备; 小白鼠: 昆明种, 本所饲养场提供, 体重  $20 \pm 2$  克; 瘤种: 昆明医学院药理教研室提供。

#### 方法:

1. 接种: 按常规接种后 7 天抽取腹水, 以生理盐水稀释至  $8 \times 10^{-6}$ , 每只鼠注射 0.2ml。

2. 给药: 各组小鼠接种后立即在皮下或腹腔按组分别注射以上纤溶组分, 去纤酶 0.2ml (含量见表 2) 或抗蛇毒血清 0.2ml。接种后第 2、4、7 天再按上述方法进行

注射, 每次注射量同上。对照组接种后不给药。

3. 酶活力测定: 取腹水 0.2ml 按王婉瑜等方法 (1983) 测定精氨酸酯酶、蛋白水解酶, 用纤维蛋白平板测定纤溶酶活性。

4. 体外试验: 用生理盐水稀释蝮蛇毒、尖吻蝮蛇毒至 1mg/ml, 取 0.2ml 加接种 7 天的腹水抽出液 0.2ml, 37℃ 保温 10 分, 台酚兰染色 (1%), 相差显微镜计数各种死细胞的百分率。

5. 体内效应: 分别抽取体内接种后 7 天的给药组和对照组的腹水, 用生理盐水稀释至  $10^7 \sim 10^8$  个癌细胞, 统计各组结果。

## 实 验 结 果

1. 体外实验 用台酚兰染色后, 在相差显微镜下按组统计 300 个细胞, 计算癌细胞数的平均死亡率。结果见表 1。

表 1 各组死细胞数百分率

项目	对 照 组		蝮 蛇 毒 组 (1mg/ml)		尖吻蝮蛇毒组 (1mg/ml)		去纤酶组 (100μg/ml)		纤溶酶组 (100μg/ml)	
	S <sub>180</sub>	EAC	S <sub>180</sub>	EAC	S <sub>180</sub>	EAC	S <sub>180</sub>	EAC	S <sub>180</sub>	EAC
死细胞(%)	21.8	25.5	81.3	80.5	87	91.3	43.1	37.5	40.3	48.0

### 2. 体内试验:

(1) 腹腔注射: 结果表明尖吻蝮蛇毒、蝮蛇毒和尖吻蝮蛇毒去纤酶, 蝮蛇毒纤溶酶对小鼠 S<sub>180</sub>、EAC 腹水瘤均有一定抑制作用 ( $P < 0.01 - 0.05$ )。见表 2。

表 2 尖吻蝮蛇毒、蝮蛇毒、去纤酶、纤溶酶对 S<sub>180</sub>、EAC 腹水瘤的抑制作用

组 别	腹腔给药剂量			实验 次数	实 验 动物数	27 天存活数 (只)		存活率(%)		与对照比 P 值	
	1 次	2 次	3 次			S <sub>180</sub>	EAC	S <sub>180</sub>	EAC	S <sub>180</sub>	EAC
对 照 组				3	30	2	1	0.7	0.3		
尖吻蝮蛇毒 (μg/只)	10	10	10	3	30	16	14	53	49	<0.01	<0.01
去纤酶 (μg/只)	25	25	25	3	30	6	4	20	13	>0.05	>0.5
蝮蛇毒 (μg/只)	10	10	10	3	30	15	12	51	38	<0.01	<0.03
纤溶酶 (μg/只)	50	50	50	3	30	4	5	13	15	>0.5	>0.5

(2) 皮下注射: 腹腔注射蛇毒可能会直接破坏肿瘤细胞, 为了验证给药途径的效果, 又进行了皮下给药试验。结果证明效果与腹腔注射相同或略有差异, 这就表明蛇毒对肿瘤疗效除直接破坏肿瘤细胞外, 尚可能与其它因素有关。结果见表 3。

(3) 抗蛇毒血清实验: 考虑到小剂量注射蛇毒给小鼠, 能在动物体内产生对抗蛇毒的抗体, 而肿瘤中分泌某些毒性物质是否与蛇毒蛋白有相关抗原, 我们用腹腔、皮下注射抗尖吻蝮蛇毒和蝮蛇毒抗蛇毒血清进行对照, 结果表明其抑瘤率与注射蛇毒相似,

同样具有明显保护率。结果见表4。

表3 尖吻蝥蛇毒、蝥蛇毒、去纤酶、纤溶酶对 $S_{180}$ 、EAC腹水瘤皮下注射的抑癌结果

组别	给药剂量的				实验次数	实验动物数	27天存活数(只)		存活率(%)		与对照比P值	
	1次	2次	3次	4次			$S_{180}$	EAC	$S_{180}$	EAC	$S_{180}$	EAC
对照组						30	0	1	0	3.3		
尖吻蝥蛇毒( $\mu\text{g}/\text{只}$ )	10	10	10	10	2	30	12	15	40	50	<0.01	<0.01
尖吻蝥蛇去纤酶( $\mu\text{g}/\text{只}$ )	30	20	20	20	2	30	4	6	13	20	>0.5	<0.5
蝥蛇毒( $\mu\text{g}/\text{只}$ )	10	5	5	10	2	30	12	11	40	37	<0.05	<0.05
蝥蛇毒纤溶酶( $\mu\text{g}/\text{只}$ )	50	40	30	30	2	20	6	6	30	30	<0.01	<0.05

表4 尖吻蝥蛇毒、蝥蛇毒抗血清对 $S_{180}$ 、EAC腹水瘤的抑制作用结果

组别	给药剂量的				实验次数	实验动物数	27天存活数(只)		存活率(%)		与对照比P值	
	1次	2次	3次	4次			$S_{180}$	EAC	$S_{180}$	EAC	$S_{180}$	EAC
腹腔注射尖吻蝥蛇毒	0.2	0.2	0.2	0.2	3	30	14	11	49	36.5	<0.01	<0.01
抗血清(ml/只)												
腹腔注射蝥蛇毒	0.2	0.2	0.2	0.2	3	30	19	14	63	47	<0.01	<0.01
抗血清(ml/只)												
皮下注射尖吻蝥蛇毒	0.2	0.2	0.2	0.2	3	30	13	16	44	53	<0.01	<0.01
抗血清(ml/只)												
皮下注射蝥蛇毒	0.2	0.2	0.2	0.2	3	30	10	12	33	40	<0.05	<0.05
抗血清(ml/只)												
对照组					3	30	1	0	0	3.3		

(4) 接种率及存活时间:我们对皮下给药一组动物(每组10只)延长观察时间至56天,结果证明它们均能延长动物的存活时间。从接种率看血清组比粗毒差,而尖吻蝥蛇毒接种率最低,见表5。

表5 用尖吻蝥蛇毒、蝥蛇毒及抗毒蛇血清试治小鼠 $S_{180}$ 、EAC腹水瘤的初步观察

组别	动物数	$S_{180}$ 总存活天数		EAC总存活天数		56天存活只数		7天接种率(%)	与对照比P值
		活天数	提高存活天数	活天数	提高存活天数	$S_{180}$	EAC		
对照组	10	223		225		0	0	100	
尖吻蝥蛇	10	366	143	319	94	3	2	0	<0.001
尖吻蝥蛇毒抗血清	10	353	130	255	130	2	2	40	<0.01
蝥蛇毒	10	371	148	385	158	3	8	30	<0.01
蝥蛇毒抗血清	10	372	149	370	145	2	1	50	<0.01

### 3. 体内腹水渗出液及酶初步测定

取接种后14天的腹水经测定蛋白水解酶、精氨酸酯酶和纤维蛋白溶解活动都很强,

见表6。

表6 精氨酸酯酶、蛋白水解酶和纤维蛋白溶解平板测定结果

组别	项目	蛋白水解酶	精氨酸酯酶	纤维蛋白溶解活性	
				标准平板 (mm <sup>2</sup> )	加热平板 (mm <sup>2</sup> )
	S <sub>180</sub>	+++	+++	280	160
	EAC	++	+	80	50
	尖吻蝥蛇毒 (mg/ml)	++	+++	120	140
	胰蛋白酶 (1000U/ml)			210	241

#### 4. 腹水瘤细胞的形态学变化

从体内腹水渗出情况看,实验组比对照组晚出现3—5天,其中注射尖吻蝥蛇毒抗蛇毒血清两组不仅腹水出现时间延迟,而且腹水渗出量和出血均明显减少,值得引起重视。细胞形态学变化比较明显,主要是细胞肿胀、膜破裂、核固缩、纤维化坏死等,在抗蛇毒血清实验组中观察到类似细胞免疫沉淀反应。见图1。

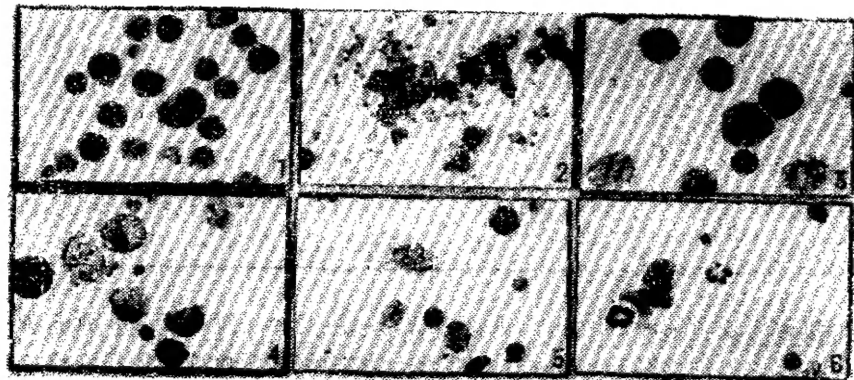


图1 腹水瘤细胞的形态学变化

- 1 正常肿瘤细胞 2 肿瘤细胞聚集 3 肿瘤细胞膜出现孔洞、坏死  
4 细胞膜破裂、坏死 5 细胞纤维化坏死 6 核固缩

## 讨 论

1. 郝文学等(1978年)报道蛇岛蝥蛇毒对小鼠S—37、S<sub>180</sub>体内具有抑制作用。临床观察20例胃癌患者治疗有效率75%,证明能改变病人临床症状,病理检查证明癌细胞变性、坏死和纤维化。Gaertner(1962年)用组织培养方法证明巴勒斯坦蝥蛇(*Vipera palestinae*)毒、彩锯鳞蝥蛇毒(*Echis colorate*)等对KB细胞株有致变和抑制作用,其中富含出血毒素的彩锯鳞蝥蛇毒抑制最强。我们的结果表明,尖吻蝥蛇毒和蝥蛇毒对肿瘤细胞有明显抑制作用,其中含较强出血毒的尖吻蝥蛇毒从抑癌率及接种率降低方面

均明显高于其它蛇毒, 结果与Gaertner 相似。

2. 李栋梁等(1976)报道, 利用组织培养方法筛选蛇毒对肿瘤细胞抑制和破坏作用, 结果观察到肿瘤细胞肿胀、核固缩、溶解、纤维化等。我们采用腹腔和皮下注射方法在体内观察到细胞形态学变化与他们的结果相似。但我们还观察到肿瘤细胞在给抗蛇毒血清后粘附增加, 肿胀和膜破裂等现象。

3. Georg Kelci David, S 等曾报道布氏杆菌疫苗 BRV-PEI 对  $S_{180}$  腹水瘤有效, 卡介苗、狂犬病苗对实验小鼠  $S_{180}$  等也有一定疗效。本文报道尖吻蝥、蝥蛇毒抗蛇毒血清对  $S_{180}$ 、EAC腹水瘤均有一定疗效, 从肿瘤引起的病理变化出血、纤溶、纤维蛋白原降低等症状与蛇毒造成DIC 症状相似。其治疗机制有待进一步研究。

4. 肿瘤腹水中具有明显的纤溶酶活性, 但  $S_{180}$ 、EAC腹水中具有精氨酸酯酶活性尚未见报道, 进而研究肿瘤患者血液和腹水中的酶, 可能对肿瘤诊断、治疗提供新的依据。

5. 我们的结果显示采用尖吻蝥蛇毒, 蝥蛇毒抗血清治疗小鼠  $S_{180}$ 、EAC腹水瘤可明显减少腹水量、延迟腹水出现和降低出血、延长存活时间, 这可能与该两种抗血清中和肿瘤产生的出血毒、凝血酶样酶和纤溶有关。

6. 蛇毒对肿瘤治疗作用国内外争议较大, 从动物和临床方面均有不同意见。我们认为采用小剂量蛇毒可能导至机体产生抗毒血清, 这点为抗血清治疗肿瘤有一定效果提供证据。其作用原理可能是肿瘤产生的某些出血, 纤溶等病理变化产物被抗血清中和, 故而延长存活时间。但需进行抗原抗体试验加以证明。

## 参 考 文 献

- 王毓瑜 1983 烙铁头 (*Trimeresurus mucrosquamatus*) 蛇毒的研究 (I) 柱层析分离。动物学研究 4 (4): 329。
- 李栋梁等 1976 应用组织培养法筛选抗蛇毒中草药实验。福建医大 (2): 6—11。
- 抗佰格等 1965 癌的病理生理学。人民出版社。
- 柯尔德等 1963 癌的扩散。上海科学技术出版社。
- 郝文学 1978 蝥蛇毒抗肿瘤试验及治疗胃癌的初步总结报告。蛇岛 辽宁省卫生局。
- Braganca, B.M. 1974 Cytotoxic proteins cobra venom as probes for membrane structure. Biomembranes, Archit. Biog. Bivenerg. Differ. Rzoc. Int. Symp. P 201.
- Chen Li zhu 1989 The clinical efficacy of snake venom capsule "787" is advanced stage malignant tumors. International Symposium of Natural Toxins May 22—25, P 194.
- Gaertner 1962 Pathological changes on CEC by vipera palestinae and Echis colorata. J. Immunology 88, 526.
- Ichiji SATO, et al. 1964 Studies on habu snake venom VI. Cytotoxic effect of habu (*T. flavoviridis hallowell*) and cobra (*Naja naja*) venom on the cells in vitro. Japan. J. EXP. 34(3): 119—124.
- Liang quangyu 1989 Snake venoms capsule cures cancers. International Symposium of Natural Toxins, May 22—25, P 193.

## TREATMENT OF $S_{180}$ , EAC ASCITES OF MICE WITH CROTALINE SNAKE VENOMS AND ANTIVENIN

Xiong Yuliang Wang Wanyu Liu Niankun  
Yang Changjiu You Fusen

(*Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica*)

This paper reported the treatment of  $S_{180}$ , EAC ascites of mice with crotaline snake venoms and antivenin. After inoculating  $S_{180}$ , EAC ascites to mice, then injected *Agkistrodon acutus* and *A. halys* venoms and *Agkistrodon acutus*, *A. halys* antivenin, the injected mice survived longer than control group and their inoculation rates decreased, but they cannot completely prohibit the growth of  $S_{180}$  and EAC ascites. The cancer cells showed the changes of necrosis, fibrosis etc. The analysis of  $S_{180}$  ascites showed the activities of arginine esterase and fibrinolysis. The activities of arginine esterase and fibrinolysis are the same as that of snake crude venoms. The treatment effect of injecting antivenin is the same as that of injecting crude venom, therefore we consider that the crude venoms can treat  $S_{180}$  and EAC ascites may be relative to the antibodies produced by mice.

**Key words:**  $S_{180}$ , EAC, *Agkistrodon halys* venom, *A. acutus* venom, Antivenin